

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

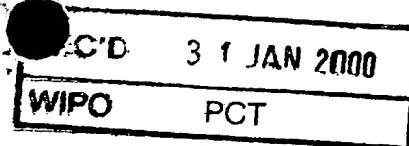
Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 12 JAN. 2000

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

31 DEC 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 16727 -

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

31 DEC 1998

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention☐ demande divisionnaire☐ certificat d'utilité☐ transformation d'une demande de brevet européen

demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant

téléphone

BLOcp226/75FR

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

REACTIF DE DETECTION ET DE SUIVI DES INFECTIONS VIRALES A VIH ET SES APPLICATIONS.

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT PASTEUR DE LILLE

&

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS

Forme juridique

Etablissement public

Etablissement public

Nationalité (s) française

Adresse (s) complète (s)

1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 LILLE Cedex FRANCE

3 rue Michel Ange, 75794 PARIS Cedex 16

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIMENSIONS

antérieures à la présente demande

n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Béatrice ORES
n° 92-4046

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉPARTEMENT DES BREVETS


26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		BLOcp226/75FR	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		98 16727	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) REACTIF DE DETECTION ET DE SUIVI DES INFECTIONS VIRALES A VIH ET SES APPLICATIONS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT PASTEUR DE LILLE & CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages)			
Nom		TRANCHAND-BUNEL	
Prénoms		Denis	
Adresse	Rue	2 rue Jacques Brel	
	Code postal et ville	59790	RONCHIN (FRANCE)
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		AURIAULT	
Prénoms		Claude	
Adresse	Rue	60 rue Louis Guislain	
	Code postal et ville	59310	NOMAIN (FRANCE)
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		GRAS-MASSE	
Prénoms		Hélène	
Adresse	Rue	321 rue de la Rosière	
	Code postal et ville	59710	MERIGNIES (FRANCE)
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU(S) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Le 3 janvier 2000,  Béatrice ORES n° 92-4046	

La présente invention est relative à un réactif de détection et de suivi des infections virales, provoquées par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et à ses applications pour la détection de l'immunodéficience humaine.

Les premiers essais de dépistage de l'infection à VIH, mis en place
5 en 1983 et 1985, utilisaient un lysat viral pour capturer les anticorps anti-VIH. Ces tests présentaient l'inconvénient majeur de manquer à la fois de sensibilité et de spécificité. En outre, du fait de l'utilisation d'un lysat viral, il existait une difficulté de reproduction des antigènes viraux de lot à lot et la nécessité d'effectuer des cultures de virus en grande quantité, ce qui présentait un danger pour le manipulateur.

10 La connaissance de la séquence complète du virus VIH1 (S. Wain-Hobson et al., Cell, 1985, 40, 9-17) a ouvert la voie à de nouvelles approches pour la production d'antigènes.

Ainsi les brevets européens EP 181 150 et EP 387 914 décrivent
15 l'utilisation du génie génétique, pour l'obtention de polypeptides (antigènes), en vue de détecter les anticorps anti-VIH1.

Ces avancées ont permis le développement du sérodiagnostic (détection des immunoglobulines dans le sérum) du VIH. Les anticorps anti-VIH1 produits sont ainsi détectés par réaction avec un ou plusieurs antigènes qui réagissent plus ou moins spécifiquement avec lesdits anticorps.

20 Toutefois, les immunoessais mettant en œuvre de tels réactifs présentent de manière générale une faible sensibilité, notamment lorsqu'il existe une faible affinité entre l'anticorps à tester et l'antigène sélectionné. Ceci est notamment le cas lors d'une séroconversion récente et/ou lors de l'apparition d'un nouveau sous-type de VIH.

25 En effet, un tel immunoessai doit être sensible, fiable, spécifique, simple et rapide ; toutefois, la sensibilité de ces tests est essentiellement fonction du choix de l'antigène ou réactif. C'est la raison pour laquelle de nombreuses recherches ont été effectuées pour mettre au point des antigènes plus sensibles et plus spécifiques.

Pour résoudre en particulier le problème du manque de sensibilité,
30 certains Auteurs, ont proposés d'utiliser, en combinaison, différents antigènes.

Les différentes voies d'approche qui ont été utilisées sont les suivantes :

- utilisation d'un ou plusieurs peptides de synthèse, de différentes régions codantes du VIH (J. Wang et al., PNAS, 1986, 83, 6159-6163); la Demande EP 220 273, par exemple, décrit une série de peptides de 6 à 49 acides aminés, et notamment un peptide contenant l'épitope immunodominant de la glycoprotéine transmembranaire gp41 (peptide 39);
- utilisation d'antigènes peptidiques marqués provenant d'un domaine du VIH (Brevet US 5 221 610);
- 10 - utilisation de peptides biotinylés issus de la gp41, de la boucle V3 ou de la gp120 : WO 93/18054 ; EP 307 149.

Les travaux sur les peptides de synthèse (J. Wang et al., PNAS, 1986, 83, 6159-6163 et Demande EP 220 273, par exemple) ont démontré l'intérêt d'utiliser des peptides de synthèse et leur mélange, pour la détection d'anticorps anti-
 15 VIH, en vue d'améliorer la qualité des dosages immunologiques à la place des protéines recombinantes ou du virus complet (lysat viral).

Les tests fondés sur l'utilisation desdits peptides ont entraîné de meilleures performances en terme de sensibilité, spécificité et reproductibilité, avec un prix de revient des réactifs diminué et l'absence de tout danger de contamination, lié à
 20 la mise en culture du virus. Ces travaux ont ensuite été suivis par de nombreuses équipes (Demande EP 0 278 148, Demande EP 0 214 709).

Toutefois, ces peptides de synthèse et leur mélange ne permettent toujours pas d'éviter les faux-négatifs (sensibilité insuffisante).

Dans le but d'atteindre une sensibilité suffisante pour pouvoir
 25 détecter les séroconversions récentes ainsi que les nouveaux sous-types de VIH, il a été proposé (Demande EP 0 857 731) d'utiliser, comme réactif :

- * des mélanges de peptides, obtenus à partir d'une séquence comprenant un domaine épitopique variable issu de la gp41, ou de la gp120 ; lesdits peptides présentent une longueur de 6 à 50 acides aminés, constituent des variantes
 30 dudit domaine épitopique (homologies de séquence d'au moins 30 % avec le domaine

épitopique natif ou une séquence consensus) et contiennent en des positions sélectivement choisies :

- au moins un groupe de marquage, d'activation ou de liaison à une phase solide et/ou
- 5 - un ou plusieurs acides aminés sélectionnés à partir d'un mélange d'acides aminés sélectionnés à partir de variants connus dudit domaine épitopique ou sélectionnés arbitrairement.

* des compositions antigéniques multimériques présentant la formule générale $P^1\{P^2[P^3(P^4)]_s\}_r$, dans laquelle P^1 , P^2 , P^3 et P^4 représentent des mélanges peptidiques tels que définis ci-dessus, $r = 1$ ou 2 , $s = 0$ à 4 et $t = 0$ à 8 , ou

* des compositions polyhapténiques de formule générale : $(P)_n T(-L)_m$ ou $T(-P-L_m)_n$, dans laquelle T représente un support, P représente les peptides du mélange de peptides, tel que défini ci-dessus, L représente des groupes de marquage ou de liaison à une phase solide, n est un nombre entier compris entre 2 et 100 et m est

15 un nombre entier compris entre 1 et 10 .

Ces différentes compositions ou mélanges contiennent généralement entre 2 et 2000 et jusqu'à 10^{10} peptides qui comprennent des séquences peptidiques individuelles différentes qui se retrouvent le plus près possible d'une distribution statistique prédéfinie ; ils peuvent être utilisés comme réactifs immunologiques.

20 Toutefois, même si ces mélanges permettent d'obtenir une meilleure sensibilité, ils ne permettent notamment pas de résoudre effectivement le problème de la détection fiable de nouveaux sous-types de virus et de virus mutés. Or, le virus VIH1 est sujet à de fréquentes mutations ; dans ce contexte, certains de ces virus sont peu ou pas détectés par ces tests en raison même des mutations qu'ils portent, ce qui a

25 pour conséquence, la non-détection des sujets contaminés par ces virus (faux négatifs).

C'est pourquoi la Demanderesse s'est donné pour but de pourvoir à un nouveau réactif de détection des infections à VIH, apte à être utilisé dans les tests immunoenzymatiques, qui soit à la fois spécifique et sensible et qui permette d'obtenir un gain de sensibilité d'au moins 15 à 30% par rapport aux réactifs de l'art antérieur.

30 Un tel réactif répond mieux aux besoins de la pratique que les réactifs de l'Art antérieur, dans le cadre des tests immunoenzymatiques, notamment de type ELISA.

Ce nouveau réactif permet notamment de résoudre effectivement le problème de la détection de nouveaux sous-types de virus et de virus mutés.

La présente invention a pour objet un réactif de détection d'une infection provoquée par un virus de l'immunodéficience humaine, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange constitué par (1) un fragment ou peptide antigénique codé par le gène *pol* du VIH1 comprenant au plus 60 acides aminés, de préférence entre 20 et 40 acides aminés et (2) un mélange (dénommé mixotope) de peptides combinatoires convergents, dérivés dudit fragment antigénique.

Au sens de l'invention, on entend par mixotope, le mélange de tous les peptides combinatoires, obtenus à partir du fragment antigénique sélectionné, par dégradation artificielle ou construite ; ils sont, de préférence, obtenus au cours d'une synthèse unique et représentent l'antigène peptidique et sa variabilité, dans sa fonction de reconnaissance d'une population d'anticorps ; différents mixotopes peuvent être obtenus à partir du même peptide ; les facteurs qui interviennent dans la constitution d'un mixotope sont :

- d'une part, le pourcentage de dégradation du peptide antigénique natif sélectionné (dégradation totale ou partielle) ; et
- d'autre part, le mode de sélection de la substitution des acides aminés dudit peptide antigénique natif ; pour chaque position de la séquence du peptide antigénique natif choisi, la substitution en acides aminés est sélectionnée sur la base de la matrice de remplacement, établie par H.M. GEYSEN et al. (*J. Mol. Recog.*, 1988, 1, 32-41), ou modifiée, comme illustrée à la figure 1, en tenant compte de la tolérance de la reconnaissance d'anticorps, en fonction de la substitution en acides aminés dans les épitopes linéaires : on choisit de préférence, pour une position donnée, les acides aminés présentant le pourcentage de "remplaçabilité" le plus élevé. Toutefois, il est préférable de prendre en compte la conformation des épitopes naturels, avant dégradation.

Le mixotope au sens de la présente invention, constitué de peptides combinatoires convergents, dérivés d'un peptide antigénique natif, représente donc une dégénérescence artificielle et non naturelle de la structure native par le rempla-

cement systématique ou partiel de chaque acide aminé par un autre issu de la matrice de remplaçabilité de GEYSEN ou de la matrice selon la figure 1.

Également au sens de l'invention, on entend par matrice de remplaçabilité construite, une matrice qui ne reproduit par les variations naturelles ou observées fréquemment dans l'évolution ; la matrice de remplaçabilité de GEYSEN ou la
5 matrice selon la figure 1, sont particulièrement adaptées.

De manière surprenante, les réactifs selon l'invention permettent d'obtenir des résultats fiables, reproductibles, très sensibles et très spécifiques, dans la mesure où les combinaisons selon l'invention présentent un effet de synergie dans la
10 détection des anticorps induits par les virus ; en particulier, on obtient un gain de sensibilité de 15 à 30 %.

Selon un mode de réalisation avantageux du réactif selon l'invention, ledit peptide antigénique correspond à un épitope de l'intégrase codée par le gène *pol* du VIH1, et correspond de préférence à la séquence
15 KIQNFRVYYRDSRDPLWKGPALLWKGEAVVIQDN (SEQ ID NO:1) (HIV-POL) ; il a l'avantage de ne posséder que peu de permutations naturelles au sein des groupes M et O et des sous-types de la classe M.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit peptide antigénique sélectionné (HIV-POL) a été dégénéré de façon rigoureuse sur la
20 base de la matrice de remplacement établie par GEYSEN et al., précité ou modifiée comme illustré à la figure 1, qui permet l'obtention de plus de 10^{10} peptides.

De manière inattendue, la combinaison d'un épitope de l'intégrase (fragment immunodominant, de préférence) avec un mixotope, dérivé dudit épitope, améliore, de manière significative, la sensibilité et la spécificité du sérodiagnostic
25 immunoenzymatique du VIH1 ; en effet, un tel réactif va permettre de capter des anticorps de faible affinité pour la séquence native. La combinaison peptide natif avec le mixotope nommé MIXO(HIV-POL) permet d'augmenter la réactivité du mélange d'antigènes vis-à-vis des anticorps naturellement produit vis-à-vis de la structure mère (haute et basse affinité pour celle-ci).

En particulier, la combinaison de HIV-POL avec son mixotope, MIXO(HIV-POL), permet d'augmenter la sensibilité de la sérodétection d'au moins 15 % tout en présentant une spécificité de 100 %.

Le mélange de peptides dégénérés, artificiellement produit, au cours
 5 d'une même synthèse est combiné avec le peptide natif. Une telle combinaison permet, de manière inattendue, d'augmenter la réactivité du mélange d'antigènes produit vis-à-vis des anticorps naturellement induits par le virus.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du réactif selon
 l'invention, il est fixé sur un support solide, de préférence des plaques de microtitra-
 10 tion.

Selon un autre mode de réalisation avantageux du réactif selon
 l'invention, le rapport fragment antigénique:mixotope dans le mélange est compris
 entre 1:10 et 1:100.

La présente invention a également pour objet un procédé de diag-
 15 nostic d'une infection à VIH, par une méthode immuno-enzymatique, caractérisé en
 ce qu'il met en œuvre un réactif selon l'invention.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, il
 comprend :

- la mise en contact d'un sérum à analyser avec un réactif tel que
 20 défini ci-dessus,
- l'addition d'anticorps anti-Ig humaines, couplés à une enzyme et
- la révélation qualitative et/ou quantitative des anticorps anti-inté-
 grase, éventuellement présents dans le sérum à analyser par addition du substrat de
 l'enzyme.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, il
 25 comprend :

- la fixation d'un réactif selon l'invention sur un support, tel qu'une
 plaque de microtitration,
- l'addition du sérum à analyser et
- la détection de la fixation des anticorps anti-intégrase présents dans
 30 ledit sérum par addition d'anticorps anti-IgG humaines, couplés à une enzyme et

- la révélation qualitative et/ou quantitative au spectrophotomètre par addition du substrat de l'enzyme.

La présente invention a, en outre, pour objet un kit ou coffret de diagnostic d'une infection virale à VIH, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif selon l'invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

10 - la figure 1 illustre une matrice de remplacement des acides aminés, modifiée par rapport à celle de H.M. GEYSEN (référence précitée) ; on obtient le mixotope MIXO(HIV-POL), forme dégénérée par remplacement systématique de chaque acide aminé par son homologue pris dans la matrice de remplaçabilité de GEYSEN.

15 - la figure 2 illustre la composition en acides aminés du peptide HIV1-POL, déterminée 24 h après une hydrolyse acide totale (HAT) (histogrammes noirs), comparée à la composition théorique, calculée sur la base d'une quantité équimoléculaire de chaque acide aminé, introduit dans les positions dégénérées (histogrammes blancs). Le code une lettre est utilisé pour les acides aminés. B représente Asn ou Asp, Z représente Glu et Gln.

20 - la figure 3 représente la composition en acides aminés du mixotope-MIXO(HIV-POL), déterminée 24 h après une hydrolyse acide totale (HAT) (histogrammes noirs), comparée à la composition théorique, calculée sur la base d'une quantité équimoléculaire de chaque acide aminé, introduit dans les positions dégénérées (histogrammes blancs). Le code une lettre est utilisé pour les acides aminés. B représente Asn ou Asp, Z représente Glu et Gln.

30 - la figure 4 illustre la réactivité IgG de 20 sérums HIV1 séropositifs (■) et de 26 sérums HIV1 séronégatifs (○), caractérisés par immunofluorescence avec le peptide HIV-POL fixé sur un support solide à raison de 0,1 µg/puits (figure 4A) ou à raison de 1 µg/puits (figure 4B). La ligne horizontale représente la valeur seuil, correspondant à la moyenne obtenue avec les sérums séronégatifs + 3 déviations

standards (SD). Ces figures comportent en abscisse le nombre de sérums et en ordonnée l'absorbance à 492 nm, avec un test ELISA mettant en œuvre la séquence HIV-POL (SEQ ID NO:1).

- la figure 5 représente l'effet du mixotope MIXO(HIV-POL) sur la réactivité des IgG des sérums HIV1 séropositifs (■) et des sérums séronégatifs (○) à deux concentrations différentes : 1 µg/puits (figure 5A) ou à 10 µg/puits (figure 5B), dans un test ELISA. La ligne horizontale représente la valeur seuil correspondant à la moyenne des sérums contrôles + 3 SD. Ces différentes figures comprennent en abscisse le nombre de sérums et en ordonnée l'absorbance à 492 nm.

- la figure 6 illustre l'effet de l'association peptide HIV-POL + mixotope MIXO(HIV-POL) sur la réactivité IgG des sérums séropositifs (■) et séronégatifs (○) dans des tests ELISA. Chaque puits de plaque de microtitration est séquentiellement revêtu de 1 µg de peptide HIV-POL et de 10 µg de mixotope MIXO(HIV-POL) et mis en contact avec les sérums.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : Préparation des réactifs selon l'invention.

a) Synthèse du peptide :

Le peptide natif HIV-POL (SEQ ID NO:1) est synthétisé en phase solide en utilisant la stratégie conventionnelle du type Boc-benzyle (ou Fmoc), dans un synthétiseur de peptides automatisé (modèle 430A, Applied Biosystems Inc.). Les groupes de protection des chaînes latérales sont les suivants : Asn (Trt), Gln (Trt), Asp (OChx), Glu (OChx), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Arg (Tos), Cys (4-MeBzl), et His (Dnp) (voir R.C. SHEPPARD, *Peptide Synthesis, Comp. Org. Chem.*, 1979, 5, 321-363).

Les acides aminés sont introduits en utilisant le protocole d'activation HBTU/HOBt avec un double couplage systématique sur une résine Boc-Gln-Pam (Applied Biosystems). Après thiolyse du groupe dinitrophényl-Dnp, suivie par une déprotection finale et un clivage à l'acide fluorhydrique, le peptide clivé et déprotégé est précipité et lavé avec du diéthyléther froid, puis dissous dans de l'acide acétique à 5 % et lyophilisé.

Le peptide est purifié à plus de 90 % sur une colonne de 5 mm x 250 mm, 100 A Nucleosil C18 RP-HPLC préparative (Macherey Nagel, Düren, FRG) et ledit peptide est ensuite caractérisé.

L'homogénéité est confirmée par HPLC analytique sur une colonne
5 Vydac C18 éluée avec un système de solvants (TFA-acétonitrile-eau), dans un appareil Shimadzu.

La pureté du peptide, supérieure à 96 % est déterminé par HPLC analytique en phase inverse.

L'identité de séquence du peptide purifié est confirmée par la détermination de la composition en acides aminés et par spectrométrie de masse enregistrée
10 sur un spectromètre de masse (MALDI) (calculé 4258,9 [M+H]⁺, trouvé 4260,0).

La composition en acides aminés (à l'exception du tryptophane), contrôlée par hydrolyse acide totale (HAT) est présentée figure 2. On observe une sous-représentation de la valine (figure 2), qui se justifie par un enchaînement d'acides
15 aminés aliphatiques difficilement hydrolysables comportant deux des trois valines (AVVI) du peptide natif HIV-POL.

b) Préparation des mixotopes :

Ceux-ci sont préparés comme décrits dans H. GRAS-MASSE et al.,
Peptide Research, 1992, 5, 4, 211-216.

20 Brièvement, des quantités équimolaires d'acides aminés protégés sont pesées et sont utilisées dans les réactions de couplage.

Pour compenser les différences de cinétique dans les réactivités des différents acides aminés, un premier couplage est réalisé avec 1 mmol (quantité totale) de Boc-acide-aminé (ou d'un mélange de Boc-acides-aminés). Un deuxième couplage,
25 utilisant 2 mmol (quantité totale), est alors systématiquement réalisé. Après un clivage à l'acide fluorhydrique, le peptide brut est dissous dans du TFA (30 ml) et précipité par ajout dudit peptide dans une solution de diéthyléther froid (300 ml).

Après centrifugation, le précipité est dissous dans l'eau et lyophilisé. Après oxydation à l'air de la solution à pH neutre, le mixotope est purifié par filtration
30 sur gel sur une colonne TSK HW40S (Merck, Darmstadt, FRG). Un aliquot de chaque mixotope purifié est soumis à une hydrolyse acide totale pendant 24 heures avec un

mélange HCl 6N:phénol (10:1), pour la détermination de la composition en acides aminés.

Le remplacement des acides aminés de MIXO(HIV-POL) est précisé à la figure 1. Après purification en gel filtration (TSK HW 40S) un échantillon de la fraction utilisée dans les tests ELISA est soumise à une HAT dont le résultat est présenté figure 3. On observe comme pour la HAT du peptide natif (HIV-POL) une sous représentation de la valine (V) mais également de l'isoleucine (I) à l'issue de la HAT du MIXO(HIV-POL). La valine étant remplacée par l'isoleucine dans le mixotope et faisant partie d'une séquence hautement hydrophobe du mixotope, et donc difficilement hydrolysable, permet d'expliquer les quantités minorées de Val et Ile dans le résultat de cette HAT (figure 3).

c) Exemples de différents réactifs conformes à l'invention :

La séquence du peptide HIV-POL et des mixotopes qui en dérivent sont représentés à la figure 1.

Ces réactifs sont, de préférence, fixés sur un support solide (microplaque) à une concentration de 0,1 µg/puits, pour le peptide HIV-POL et à une concentration de 10 µg/puits pour les mixotopes.

EXEMPLE 2 : Test immuno-enzymatique mettant en oeuvre un réactif selon l'invention pour la sérodétection du VIH1.

A. Matériel et méthodes :

- ELISA :

Des puits de plaques de microtitration (Nunc, Maxisorp, Rocksilde, Danemark) sont recouverts pendant une nuit à 4°C, soit avec 0,2 ml de peptide HIV-POL (SEQ ID NO:1), soit avec un mixotope (MIXO(HIV-POL) (0,5 µg/ml dans 50 mM de NaHCO_3 , pH 9,6), soit séquentiellement avec 0,2 ml de peptide HIV-POL (0,5 µg/ml) et 0,2 ml de mixotope (MIXO(HIV-POL) (50 µg/ml).

Chaque puits est ensuite lavé avec un tampon phosphate 0,01 M comprenant du NaCl 1,8 %, pH 7,4 (PBS) et les sites de liaison en excès sont bloqués par de l'albumine (addition de 0,3 ml de BSA 2 % (sérum albumine bovine) dans du PBS, à 37°C, pendant 60 minutes).

Après 3 lavages avec 0,3 ml de PBS 0,5 %-Tween 20 (Sigma) (tampon PBS-T), les sérums humains à tester sont dilués au 1/50 dans du PBS-T comprenant de la sérum albumine bovine (BSA) 2 % et sont incubés dans des puits contenant le réactif selon l'invention comme précisé ci-dessus, pendant 120 minutes à 37°C, dans une atmosphère humidifiée.

Après 4 lavages, les conjugués peroxydase-anticorps de chèvre-anti-IgG-A-M humaines (Diagnostic Pasteur), dilués au 1/10 000 dans du tampon PBS-T comprenant de la BSA 2 %, sont incubés pendant 60 minutes à 37°C.

L'anticorps conjugué, qui se lie aux Ig fixées sur le support, est révélé pour son activité peroxydase, en utilisant comme substrat du dihydrochlorure d'o-phénylènediamine et de l'H₂O₂, dans un tampon citrate 0,05 M, pH 5,5, pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante.

La réaction est bloquée par l'addition d'H₂SO₄ 4N (50 µl). L'absorbance est enregistrée contre un blanc à 492 nm A₄₉₂), avec un lecteur automatique multicanaux (M_R 5000, Dynatech).

La moyenne A₄₉₂ + 3 déviations standards (SD) des échantillons séronégatifs est utilisée comme valeur seuil dans les tests ELISA.

- Mesure de l'avidité de la liaison à l'anticorps :

La spécificité de liaison des sérums positifs aux différents mixotopes en phase solide est évaluée par l'absorption des anticorps par l'antigène HIV-POL natif en solution, en utilisant la méthode de B. FRIGUET et al. (J. Immunol. Methods, 1985, 77, 305-319).

Cette méthode est basée sur la mesure de la concentration en anticorps libre par une méthode ELISA indirecte, lorsque l'antigène HIV-POL et les anticorps sont à l'équilibre en solution.

L'antigène HIV-POL, à différentes concentrations (10⁻¹⁰ M à 2.10⁻⁶ M) est d'abord incubé en solution (tampon PBS-T + BSA 2 %) avec un sérum séro-positif, à concentration constante (1/50) jusqu'à l'atteinte de l'état d'équilibre.

Après une incubation pendant 18 heures à 4°C, 200 µl de chaque mélange est transféré et incubé pendant 60 min à 20°C dans les puits d'une plaque de microtitration, préalablement recouverte de peptide HIV-POL (0,2 ml, correspondant à

0,5 µg/ml) ou d'un mixotope (MIXO(HIV-POL) (50 µg/ml, 0,2 ml), dans du NaHCO_3 50 mM, pH 9,6.

Après lavage avec du tampon PBS-T, les immunoglobulines liées sont détectées par addition d'anticorps de chèvre anti-IgG-A-M humaines, couplés à
5 de la peroxydase.

L'anticorps conjugué, qui se lie aux Ig, est révélé par l'activité peroxydase comme décrit ci-dessus. Cette méthode donne les courbes de déplacement de la liaison A/Ao par rapport à $\log(ao)$. Une estimation précise de l'avidité moyenne du sérum contenant les anticorps anti-HIV-POL est donnée par l'équation
10 $Ao/(Ao-A)=1/v=1+Kd/ao$, dans laquelle ao est la concentration en antigène soluble total, A et Ao sont les absorbances à 492 nm avec ou sans antigène bloquant, respectivement et v est la fraction d'anticorps lié, si les différentes conditions exposées dans FRIGUET et al. sont satisfaites.

B. Résultats

15 a) Liaison anticorps sériques HIV-POL (ELISA HIV-POL) :

La réactivité des Ig-G humaines anti-HIV-POL vis-à-vis du peptide HIV-POL est analysée par un test ELISA, sur différents sérums : 20 sérums séropositifs (confirmés en western blot) et 26 sérums séronégatifs.

65 % des sérums HIV1 séropositifs (13 sérums sur 20) dilués au
20 1/50 sont détectés avec l'antigène HIV-POL utilisé à une concentration de « coating » de 0,1 µg/puits (figure 4A). Une concentration supérieure (1 µg/puits) entraîne l'apparition d'un sérum faux-positifs faisant chuter la spécificité de 100 % à 95 % (figure 4B).

b) Liaison anticorps sériques mixotopes (ELISA mixotope) :

25 Les mixotopes ont été testés comme antigènes en phase solide, à deux concentrations, à savoir 0,1 µg et 10 µg/puits (figure 5).

L'utilisation de MIXO(HIV-POL) seul dans les tests ELISA (figures 5A et 5B) n'est pas satisfaisante, puisque la sensibilité de la détection des IgG ne dépasse pas 50 % à la meilleure concentration de coating (figure 5B).

En revanche, on constate avec le mixotope MIXO(HIV-POL), une diminution du signal produit par les sérums de patients HIV1 séronégatifs. Cette propriété du mixotope est mise à profit dans le test de combinaison des peptides.

- c) Liaison anticorps sériques-réactif selon l'invention (combinaisons peptide HIV-POL+ mixotope) (ELISA HIV-POL + mixotope) :

Si un "coating" séquentiel des plaques ELISA est réalisé avec le peptide natif à une concentration de 1 µg/puits entraînant une diminution de la spécificité (figure 4B) puis avec son mixotope MIXO(HIV-POL) à sa concentration la plus efficace (10 µg/puits), on observe (figure 6) que cette combinaison ne laisse apparaître aucun sérum faux-positif et, surtout, permet de passer de 65 % (peptide natif seul) à 80 % de détection des sérums HIV1 positifs. La combinaison de HIV-POL avec son mixotope, MIXO(HIV-POL), a permis d'augmenter la sensibilité de la sérodétection de 15 % tout en présentant une spécificité de 100 %.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

1°) Réactif de détection d'une infection provoquée par un virus de l'immunodéficience humaine, caractérisé en ce qu'il comprend un mélange constitué par (1) un peptide antigénique codé par le gène *pol* du VIH1 comprenant au plus 60 acides aminés; de préférence entre 20 et 40 acides aminés et (2) un mélange, dénommé mixotope, de peptides combinatoires convergents, dérivés dudit peptide antigénique.

2°) Réactif selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide antigénique correspond à un épitope de l'intégrase codée par le gène *pol* du VIH1.

3°) Réactif selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit peptide antigénique correspond à la séquence KIQNFRVYYRDSRDPLWKGPakLL WKGEgAVVIQDN (SEQ ID NO:1) (HIV-POL).

4°) Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le mixotope correspond à une dégénération de l'ensemble du peptide antigénique sélectionné.

5°) Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est fixé sur un support solide, de préférence des plaques de microtitration.

6°) Réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le rapport peptide antigénique:mixotope dans le mélange est compris entre 1:10 et 1:100.

7°) Procédé de diagnostic d'une infection à VIH1, par une méthode immuno-enzymatique, caractérisé en ce qu'il met en œuvre un réactif de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact d'un sérum à analyser avec un réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6,
- l'addition d'anticorps anti-Ig humaines, couplés à une enzyme et

- la révélation qualitative et/ou quantitative des anticorps anti-intégrase, éventuellement présents dans le sérum à analyser par addition du substrat de l'enzyme.

9°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la fixation d'un réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 sur un support, tel qu'une plaque de microtitration,

- l'addition du sérum à analyser et

- la détection de la fixation des anticorps anti-intégrase présents dans ledit sérum par addition d'anticorps anti-IgG humaines, couplés à une enzyme et

- la révélation qualitative et/ou quantitative au spectrophotomètre par addition du substrat de l'enzyme.

10°) Kit ou coffret de diagnostic d'une infection virale à VIH1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un réactif selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

HIV-POL	K	I	Q	N	F	R	V	Y	Y	R	D	S	R	D	E	L	W	K	G	P	A	K	L	L	W	K	G	E	G	A	V	V	I	Q	D	N
MIXO(HIV-POL)	K	I	Q	N	F	R	V	Y	Y	R	D	S	R	D	E	L	W	K	G	P	A	K	L	L	W	K	G	E	G	A	V	V	I	Q	D	N
	R	V	N	Q	L	K	I	F	F	K	E	H	K	E	Q	I	F	R	G	R	I	I	F	R	D	G	I	I	V	N	E	Q				

FIGURE 1

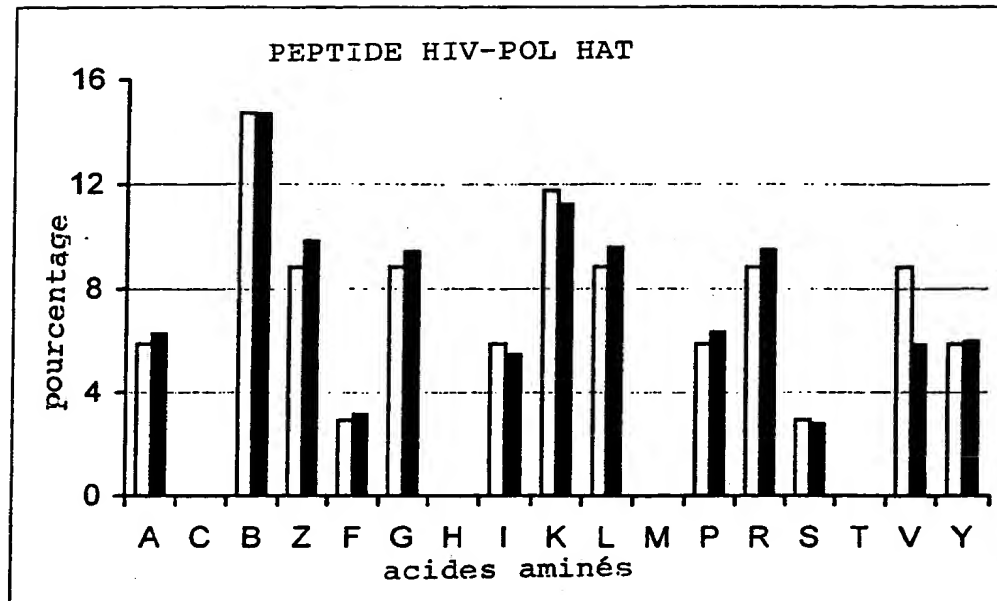


FIGURE 2

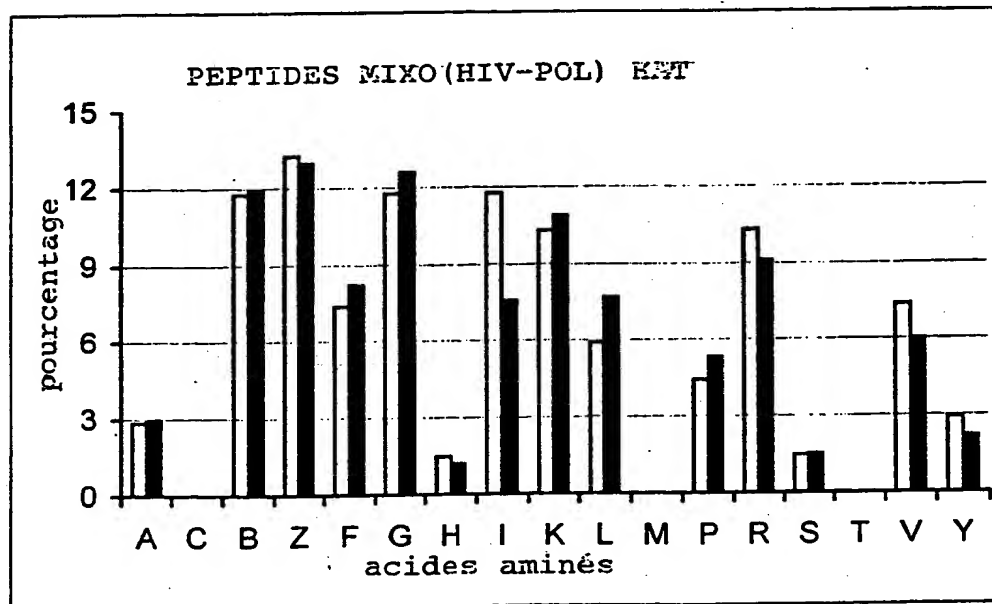


FIGURE 3

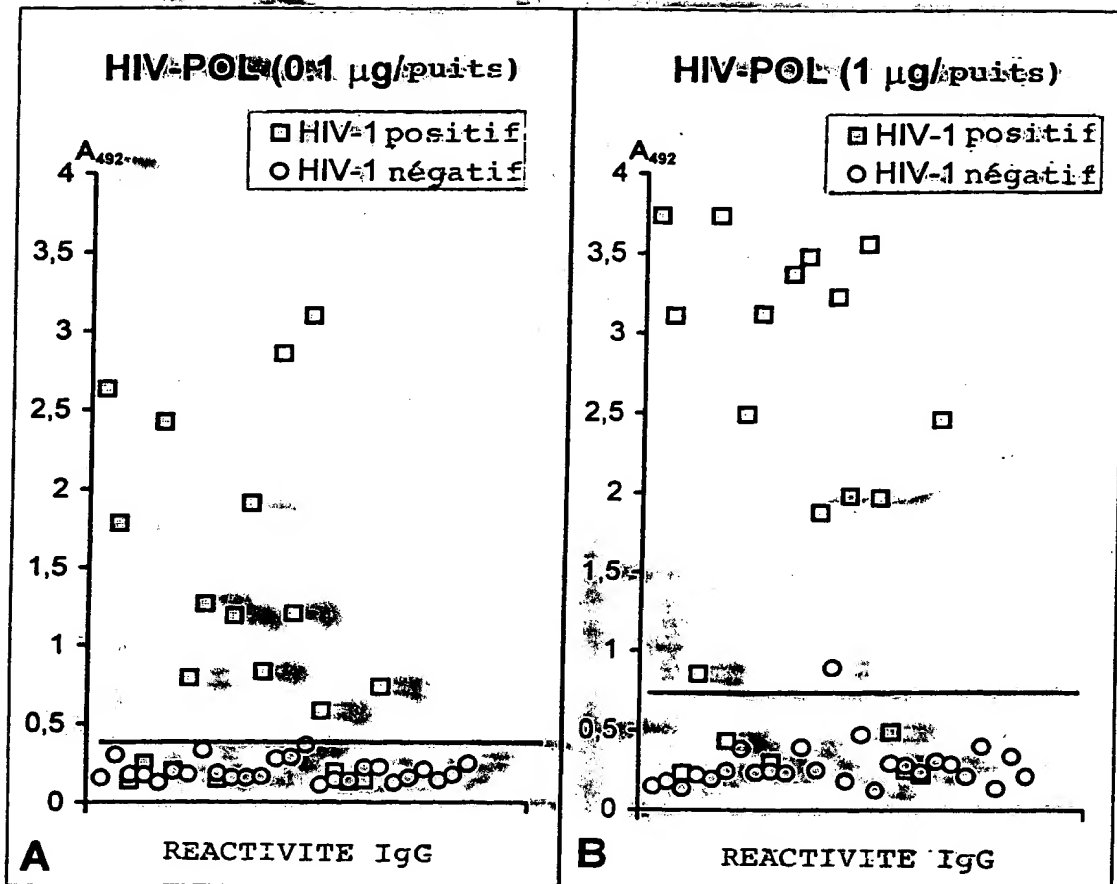


FIGURE 4

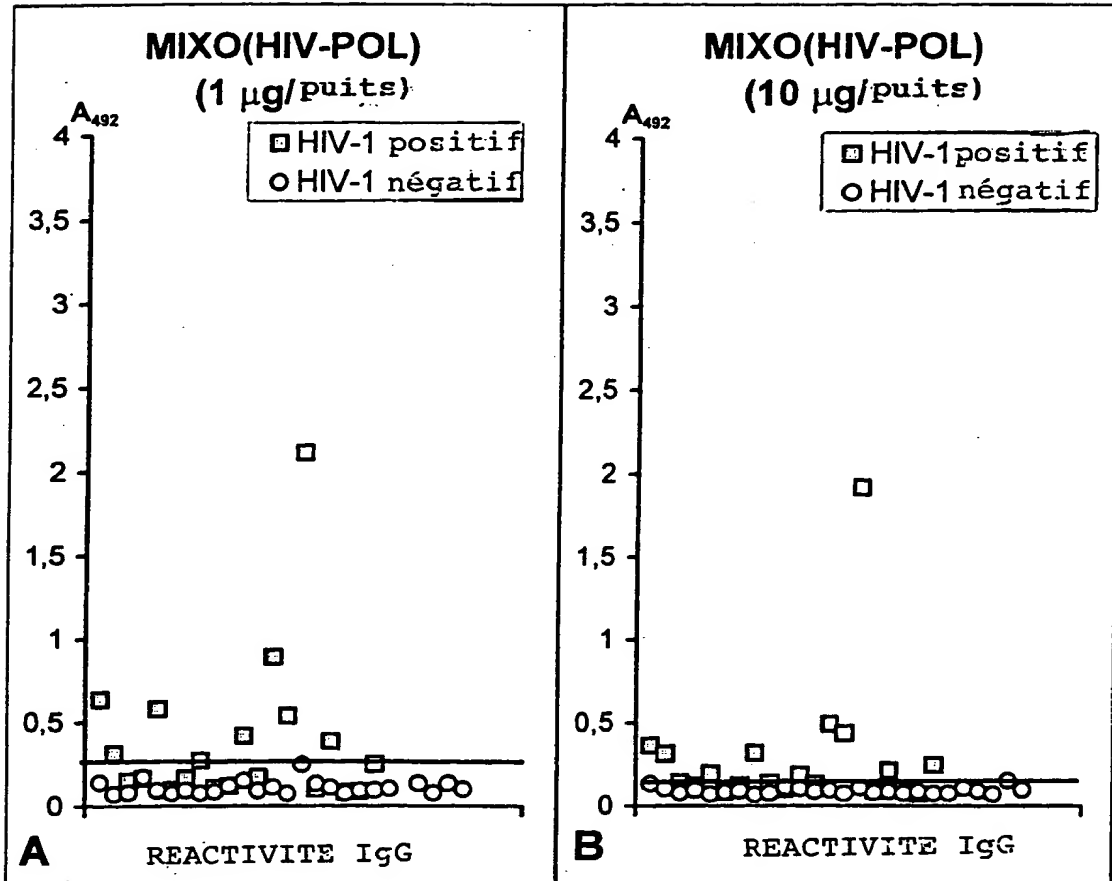


FIGURE 5

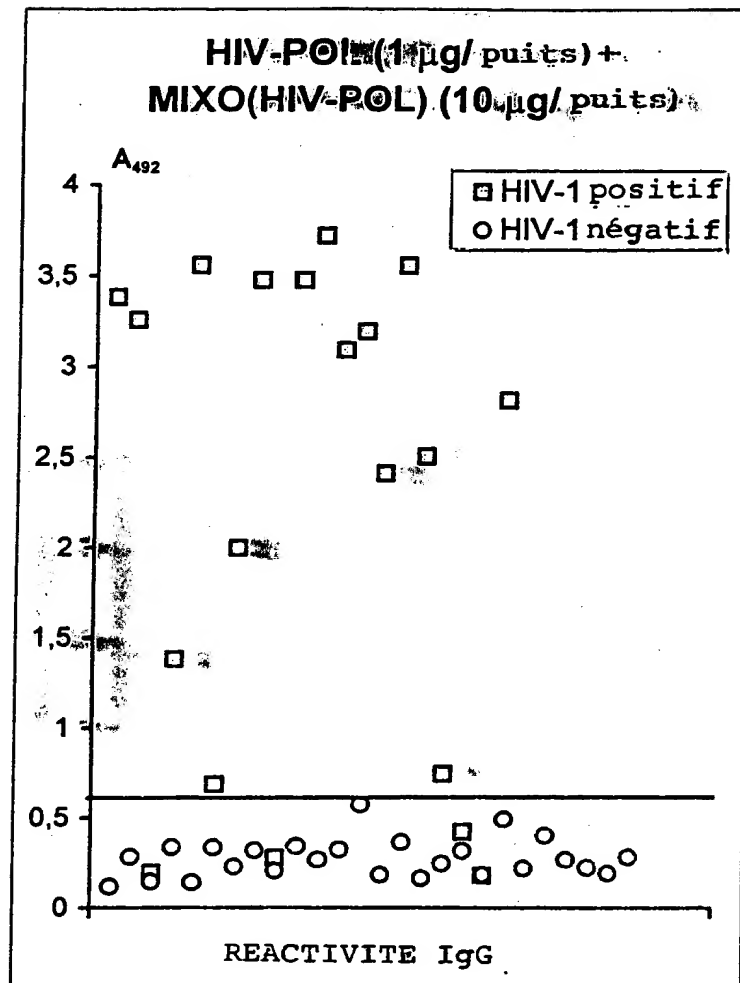


FIGURE 6